

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-12630

⑬ Int.Cl.
 A 61 K 39/395

識別記号 廷内整理番号
 7043-4C

⑭ 公開 昭和61年(1986)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 6 (全25頁)

⑮ 発明の名称 免疫毒素およびその製造法

⑯ 特願 昭60-135215

⑰ 出願 昭60(1985)6月20日

優先権主張 ⑲ 1984年6月20日 ⑳ フランス(FR) ⑳ 8409703

㉑ 発明者 フランツ・ジャンセン フランス国, 34160 カストリエ, アツサ, シュマン・

デ・フレスケ (番地無し)

㉒ 発明者 ピエール・グロ フランス国, 34100 モンペリエ, リュ・デ・ムーリエ 1

8

㉓ 出願人 サノ・フイ フランス国, 75008 パリ, アブニユ・ジヨルジユ・サン
 クエム 40

㉔ 代理人 弁理士 鈴江 武彦 外2名

明細書

1. 発明の名称

免疫毒素およびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) リシンのA鎖と抗体をカップリングさせて得られる次の一般式を有する免疫毒素。



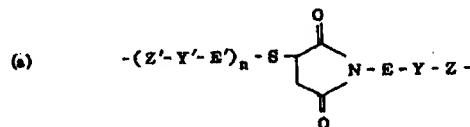
(上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。Wは、チオエーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシスティンのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子團に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子團に結合している官能基を有する分子が介在して前記原

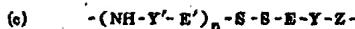
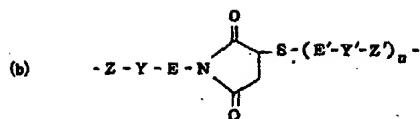
子團と結合している。但し、Wがジスルフィド基を含む場合、前記ジスルフィド基のイオウ原子の1つがAのシスティンのうちの1つに属するものであるときは、他方のイオウはアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合している。)

(2) リシンのA鎖と抗体Pとをカップリングさせて得られる次の一般式を有する免疫毒素。

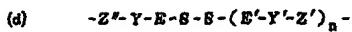


(上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。





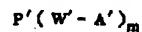
または



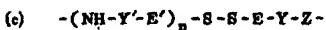
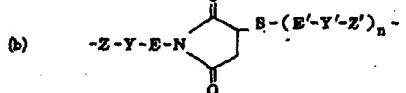
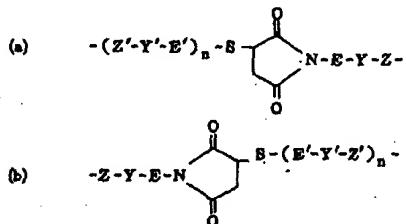
(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Zは上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'および

Z'基のいずれか1つと共有結合し得る能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。))

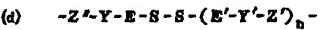
(3) 抗体PをリシンのA鎖でカップリングして得られる次の統計的一般式を有する免疫毒素。



[上式中、mは0.3ないし1.2の数値を示す。P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。

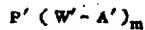


または



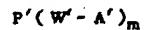
(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子団を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Zは上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'基のいずれか1つと共有結合し得る能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。))

(4) 次の一式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



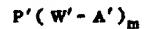
(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'は抗体断片FabまたはFab'を示し、nおよびmは0.3ないし2の範囲の数を示す。)

(5) 次の一式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



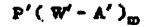
(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'は抗体断片 $\text{F}(\text{ab})_2$ を示し、nおよびmは0.5ないし4の範囲の数を示す。)

(6) 次の一式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'はIgM型の抗体を示し、nおよびmは0.5ないし6の範囲の数を示す。)

(7) 次の一式で表わされる特許請求の範囲第3項記載の免疫毒素。



(上式中、W'およびA'は特許請求の範囲第3項記載の通りであり、P'はIgM型の抗体を示し、nおよびmは1ないし12の範囲の数を示す。)

(8) 一般式



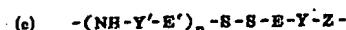
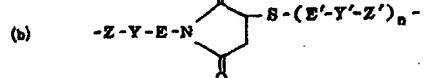
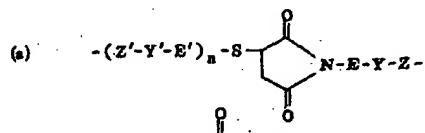
[上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。Wは、テオエーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシスティンのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子團に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子團に結合している官能基を有する分子が介在して前記原子團と結合している。但し、Wがジスルフィド基を有する場合、前記ジスルフィド基のイオウ

原子の1方がリシンA鎖のシスティンに属するものであるとき、他方のイオウ原子はアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合したものである]で示される免疫毒素の製造方法であって、直接または介在基を介して結合した少なくとも1つの遊離テオール基を有するタンパクであつて場合に応じて修飾されているリシンのA鎖または抗体または抗体の断片であるものP₁を、タンパクP₁の遊離テオールと結合してテオールエーテルまたはジスルフィド結合を形成し得る原子團を有する、タンパクP₁とは異なるタンパクであつてリシンのA鎖または抗体または抗体の断片であるものP₂と、室温にて水溶液中で反応させることを特徴とする免疫毒素の製造方法。但し、ジスルフィド結合が形成される場合にタンパクP₁がリシンのA鎖であるときは、該ジスルフィド結合はアミノ基以外の前記タンパクP₂の基との間に形成される。

(9) 一般式で示される免疫毒素を製造する方



[上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものと示す。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。

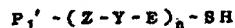


または

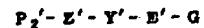


(上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子團を示し、1つのテロシン残基の水

酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を通ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Zは上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ'基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。)で示される免疫毒素の製造方法であつて式

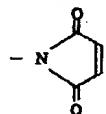


で示されるタンパクを次の一般式のタンパクと室温にて水溶液中で反応させることを特徴とする免疫毒素の製造方法。



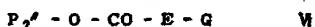
(上式中、P'_1およびP'_2はP₁およびP₂の原子

団であって前記タンパクに属する基に結合している、または抗体若しくは抗体断片の糖鎖を過ヨウ素酸との反応により開裂して得られるタンパク P₁ または P₂ の 1 つの原子團である。また Z, Z', Y, Y', E および E' は上記のとおりであり、G は次の基を示す。



または G は -S-S-X 基 (X は活性基) である。G が -S-S-X 基であり、P₁' がリシンの A 鎮である場合、n は 1 であるが 0 であることもある。しかしこの場合 Z' は -NH- 以外である。】

即ち以下の一般式で表わされる生成物。



[上式中、P₂'' は次の(a), (b)から選ばれるタンパクのラジカルを示す。

(a) 抗体または抗体断片、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片、または官能基のどれか 1 つを人工的に修飾させることによりこれら

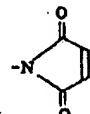
の分子から由来する分子。

(b) リシンの A 鎮または官能基のどれか 1 つを人工的に修飾させることによりこれらの分子から由来する分子。前記タンパクの一部から除かれたチロシンのフェノール性水酸基の 1 つ以上は上記ラジカルから除去されている。

・碘素原子は、タンパクのラジカル P₂'' から消失するフェノール性水酸基に属するもの。

・E は不活性介在分子を示す。および

・G は



または -S-S-X (X は活性基) を示す。】

a. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は新規な細胞毒性包合体、その製造方法および細胞毒性作用のある組成物に関する。

〔従来の技術とその問題点〕

米国特許第 4,340,535 号には、創癌剤の

製造法が記載されているが、それはリシンの A 鎮とタンパクとが共有結合により結合されて得られる包合体あるいは免疫毒素と呼ばれている。そのタンパクは、例えば抗体すなわち免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片、または官能基のどれか 1 つを人工的に修飾させることによりこれら

特定の抗原を特異的に認識することができる。上記の特許に記載されている包合体の特徴は、次の三つの性質が同時に備わっているということである。

(1) リシンの A 鎮と抗体との間の共有結合がジスルフィド結合である。

(2) ジスルフィド結合を形成しているイオウ原子の 1 つは常にリシンの A 鎮の 257 番目に有するシスティン残基のイオウ原子である。

(3) リシンの A 鎮と抗体とを結びつける結合手は抗体ペプチド鎖の NH₂ 末端に固定されている。

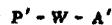
ところが、この種の抗癌剤の特徴である特異的細胞毒性を有する包合体を得るために、必ずしも上記の条件が同時に満たされる必要がないことが今や明らかとなつた。

〔問題点を解決するための手段〕

この発明は免疫毒素の部類に属する生成物に関する。それは、一方がリシンの A 鎮それ自体または適当に修飾したもの（以後 A と称す）他

方が抗体または抗体の断片それ自体または適当に修飾したもの（以後Pと称す）を共有結合させて得られる。後者は標的細胞が抱っている抗原を特異的に認識し得る。2つのタンパクはジスルフィド結合またはテオエーテル結合により結合されている。

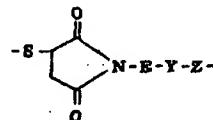
一つの観点に立つと、この発明は抗体PとリシンのサブユニットAを結合させて形成される免疫毒素に関する。それは次の一般式で示される。



上式中、P'は抗体または抗体の断片であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。すなわちタンパクの様々な基の少なくとも1つが除かれたり、他の官能基が任意に保護されている。A'はリシンのA鎖であるタンパクのラジカルそれ自体または適宜化学的に修飾したものを示す。すなわちタンパクの様々な基の少なくとも1つが除かれたり、他の官能基が任意に保護されている。Wは、テオ

エーテル基またはジスルフィド基を含む2価の共有結合構造を示す。この場合ジスルフィド基においては、両イオウ原子はPおよびAのシスティンのそれか、または両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する原子團に結合している。この後者の場合、両イオウ原子はPおよびA若しくはそのいずれかに属する前記原子團に結合している。官能基を有する分子が介在して前記原子團と結合している。但し、Wがジスルフィド基を含む場合、前記ジスルフィド基のイオウ原子の1つがAのシスティンのうちの1つに属するものであるときは、他方のイオウはアミノ基以外のタンパクPの基に結合した官能基を有する介在分子によりタンパクPに結合している。

2つのタンパク間のテオエーテル結合は、次の型である。

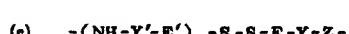
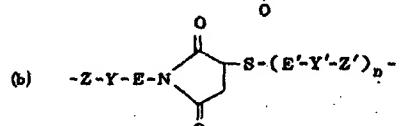
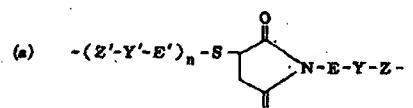


上式中のZ、YおよびEは以下に定義する。

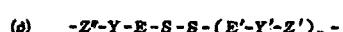
この発明は特に次の一般式の免疫毒素に関する。



上式中のP'およびA'は上記のとおりである。W'は次の群から選ばれる共有結合構造を示す。



または



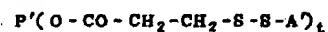
上式中、ZおよびZ'はタンパクAおよびPに属する原子團を示し、1つのチロシン残基の水酸基に由来する酸素原子、AおよびPのグルタミ

ン酸およびアスパラギン酸またはそのいずれかの末端ないし遊離カルボキシル基の1つに由来のカルボニル基、Pの糖鎖を過ヨウ素酸で酸化したあと得られるジアルデヒド構造に由来の基、および1つのリシン残基のε位のアミンの1つ若しくはAおよびPの末端アミンの1つに由来の-NH-基から選ばれる。Z'は上記のZおよびZ'と同じであるが、-NH-ではあり得ない。YおよびY'はタンパクPおよびAのZ、Z'およびZ''基のいずれか1つと共有結合し得る官能基を示す。EおよびE'は不活性な介在分子を示す。そして、nは0または1である。

この発明の免疫毒素は上記の一般式IおよびIIにより簡略された型で示されるが、2価の共有結合構造-W-または-W'-は、少なくとも1つのP分子および少なくとも1つのA分子に結合している。タンパクPおよびAとの結合数は、結合過程に因する前記タンパクに属する原子團の数に応じて異なる。

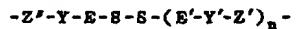
例えば、免疫毒素がジスルフィド基を有する

2価の共有結合 造を介して天然リシンのA鎖と抗体P（例えば、T101抗体）との結合により形成されるならば（この場合、ジスルフィド基のイオウの一方はリシンA鎖の257番目のシスティンに属するものであり、もう一方はオキソプロピル基によって抗体Pのテロシン残基のフェノール基の酸素に結合している）、その一般式は次のようになる。



上式中、tは結合に関与する抗体（例えば、T101抗体）中のテロシン残基の数を示す。

この結果得られる免疫毒素は、一般式Ⅱに相当する化合物であって一般式Ⅱにおいて以下の定義を有するものである。すなわちP'は上記のとおりであるが、時にはテロシン残基のフェノール基が除かれたT101抗体の原子団を指す。Aも上記のとおりであるが、時には257番目のシスティン残基のテオール基が除かれたリシンのA鎖の原子団を指す。そしてW'は基(c)すなわち



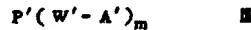
り得る。 $P(ab')_2$ が用いられると、mは0.3から約2の間にあり得る。またIgG型の抗体では、mの値は0.5ないし6となる。最後に、IgM抗体の場合、mの値は1ないし12の数を取り得る。しかし抗体Pの置換の程度は、mの値が0.5以上、1.0以下となるようなものにすることが好ましい。

また、すでに説明したように構造ⅠおよびⅡは簡略化した型で記された統計的一般式である。同様に、以下の一般式Ⅳ、VおよびVIも統計的一般式である（nが1であるときは）。これらの結合性反応体は、タンパクP₁およびP₂の群から構成されるからである。そのP₁およびP₂は、これら自体が抗体PまたはリシンのA鎖のいずれであろうと、抗体Pに関して上記で考慮した特徴と全く同一の特徴を有する。

もう一方の観点に立つと、この発明は上記構造式Ⅰを有する免疫毒素の製造法に関する。この方法において、直接または介在基を介して結合した少なくとも1つの遊離テオール基を有す

である。この式中、Gは結合に関与するフェノール性水酸基の酸素を示し、Yは-CO-、Eは不活性介在分子-CH₂-CH₂-であり、nは0である。

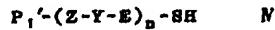
特に好ましくは、リシンのA鎖および抗体単分子Pに含まれる1つ以上の構造により形成される免疫毒素が挙げられる。それは次の一般式で示される。



上式中、P'、W'およびA'は上記のとおりであり、mは結合に関与するタンパクPに属する原子団の数を示す。mの数は0.3ないし1.2であるが、0.5から1.0が好ましい。「mの数が0.3ないし1.2であるが、0.5から1.0が好ましい」という表現は、結合が抗体分子の集団内で均一に生じないため、mの値が統計的な値であるという意味である。したがってmの数は整数でなくともよい。特にmの値は使用される抗体に依存し、さらに詳しくはその分子量に依存する。抗体断片FabまたはFab'が出現抗体Pとして使われるとなると、mの値は0.3から約2の間とな

るタンパクP₁（場合に応じて修飾されているリシンのA鎖または抗体または抗体の断片）を、タンパクP₁の遊離テオールと結合してテオールエーテルまたはジスルフィド結合を形成し得る原子団を有する、タンパクP₂とは異なるタンパクP₂（リシンのA鎖または抗体または抗体の断片）と、室温にて水溶液中で反応させる。但し、ジスルフィド結合が形成される場合にタンパクP₁がリシンのA鎖であるときは、ジスルフィド結合はアミノ基以外の前記タンパクP₂の基との間に形成される。

更に、この発明は好ましくは構造式Ⅱを有する免疫毒素の製造法に関する。ここでは、P'、W'およびA'は上記のとおりである。この方法においては、次の一般式

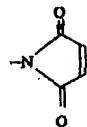


で示されるタンパクを次の一般式のタンパクと室温にて水溶液中で反応させる。



上式中、P₁'およびP₂'はP₁およびP₂の原子団

であって前記タンパクに属する基に結合している、または抗体若しくは抗体断片の糖鎖を過ヨウ素酸との反応により開裂して得られるタンパク P₁、または P₂ の 1 つの原子団である。また Z、Z'、Y、Y'、E および E' は上記のとおりであり、G は次の基を示す。



または G は -S-S-X 基 (X は活性基) である。O が -S-S-X 基であり、P₁' がリシンの A 鎮である場合、n は 1 であるが 0 であることもある。しかしこの場合 Z' は -NH- 以外である。

従って、P および A 双方は、次の基のいづれかを有する。

- (1) 結合に関与する 1 個以上のチオール基、および
- (2) 上記チオール基と反応してジスルフィドまたはチオエーテル結合を形成し得る 1 個以上

飾して A 鎮から由来するいかなる分子をも示す。但し、無細胞系において証明できるように、これらのタンパクは直接細胞においてリボソームのタンパク合成を阻害するといり性質をな有するものである。

記号 P' は、上記タンパク P それ自体またはそれを適宜化学的に修飾したものから得られるラジカルを示す。化学修飾タンパクには、それからそれ自体の基の 1 つ以上が除かれたもの、またそれに他の官能基が任意に保護されているものが含まれる。

記号 A' は、上記タンパク A それ自体またはそれを適宜化学的に修飾したものから得られるラジカルを示す。化学修飾タンパクにはそれからそれ自体の基の 1 つ以上が除かれたもの、またそれに他の官能基が任意に保護されているものが含まれる。

記号 P₁ は、上記のタンパク A および P の 1 つを示す。それは、直接または介在分子を経て上記タンパクに結合している遊離チオール基を

の官能基。この発明では、記チオール基および官能基は天然のタンパク P または A のものであるか、または人工的に修飾されたものである。

以下に上記のタンパクまたはその原子団を表わすために使われる記号の意味および様々な記号を表わすのに使われる表現の意味するところを記載して、内容を明確にしておく。記号 P は、いかなる抗体または抗体の断片すなわちいかなる免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの断片、またはいかなる分子であってその官能基のいずれか 1 つを人工的に修飾して得られるものを示す。官能基としてはそれらタンパクに付いている糖鎖構造を含む。但し、修飾されたタンパクは、細胞とりわけ癌細胞の表面に存在する特異抗原をなを特異的に認識し得るものでなければならない。

記号 A はタンパクであるが、植物毒素の A 鎮と称されるサブユニットである。それは天然のリシンから直接得ることもできるし、このタンパクに付いているいかなる官能基を人工的に修

有する。

記号 P₂ は、P₁ とは異なり、上記のタンパク A および P の 1 つを示す。それは、上記遊離チオール基と結合し得る 1 つ以上の官能基を有する。

記号 P₁' は、タンパク P₁ 属する原子団、特に SH 基 (システィンの)、NH₂ 基 (タンパクの末端またはリシンの N 位)、OH 基 (テロシンの) または COOH 基 (アスパラギン酸およびグルタミン酸の) に結合した、P₁ のラジカルを示す。または P₁' は、P₁ が抗体または抗体断片である場合、過ヨウ素酸との反応により糖鎖を開裂することによって得られるタンパク P₁ のラジカルを示す。

記号 P₂' は、特徴的な官能基 NH₂ (タンパクの末端またはリシンの N 位)、OH (テロシン) または COOH (アスパラギン酸およびグルタミン酸) に結合している、タンパク P₂ のラジカルを示す。

例を挙げると、P₁'-SH は、システィンの SH 基がそのままで他の官能基が場合に応じて保護

されているタンパク P₁ (抗体または抗体断片 P またはリシンの A 領) を示す。

同様に、P₁-CO- は、末端カルボキシ基、またはそのグルタミン酸およびアスパラギン酸のカルボキシル基が SH 基を人工的に導入する基と結合されたタンパク P₁ を示す。

更に P₂-NH- は、末端アミノ基またはリシンのアミノ基がタンパク P₁ のチオール基と結合し得る基についているタンパク P₂ (抗体または抗体断片 P またはリシンの A 領) を示す。

Z および Z' に関して用いられている「不活性介在分子」という用語は、この発明の方法に用いられる反応体に対して不活性な 2 個の有機原子団を示す。例えば、炭素数 1 から 15 の直鎖または分枝アルキレン基が挙げられる。これらは 1 つ以上の二重結合を有してもよいし、酸素原子が介在してもよい。またはメチル基、遊離若しくはエステル化されたカルボキシル基、ジアルキル基またはカルバメート基のような 1 つ以上の不活性官能基によって置換されていても

よい。同じ用語は炭素数 6 から 15 のアリーレン基も示す。これはアルキレン基について上に述べたような 1 つ以上の不活性官能基で置換されていてもよい。

Y および Y' に関して用いられている「共有結合し得る官能基」という用語は、タンパク P₁ および P₂ に属する基と反応して共有結合を形成し得る原子団(基)を指す。例えば、-CO- 基および-(C=NH)- 基は、タンパクの遊離アミン、チオールおよびフェノール性水酸基と反応し得る官能基とに適している。同様に -NH- 基は、P₁ または P₂ が抗体または抗体断片のとき、過ヨウ素酸で酸化した後タンパク P₁ または P₂ の糖鎖構造の 2 つの炭素原子と結合し得る官能基として適している。

「タンパクに属する原子団」という用語は、ここでは Z 、 Z' および Z'' に関して用いられているが、タンパク P₁ および P₂ を形成しているアミノ酸の特徴的な原子団に由来する原子団のことを指す。例えばチロシンおよびセリンの水酸

基由来の酸素原子、アスパラギン酸、およびグルタミン酸の末端カルボキシル基すなわち遊離カルボキシル基由来のカルボニル基、タンパクの末端アミノ基またはリシンのアミノ基由来の-NH- 基、またはシスティンのチオール基由来のイオウ原子が挙げられる。同じ用語は、P₁ または P₂ が抗体または抗体断片の場合、過ヨウ素酸処理によりタンパク P₁ または P₂ の糖鎖の 1 つを酸化したのち得られるジアルデヒド構造由来の基をも指す。

「活性ラジカル」という言葉は、ここでは X に関して使われているが、-S-S- 架橋に結合した基であって、遊離チオール基と反応して X-SH を放出しジスルフィド結合を形成し得基を指す。活性基としては、ピリジン-2-イルおよびピリジン-4-イルが適しており、それらは 1 つ以上のハロゲンまたはアルキル、カルボキシルまたはアルコキシカルボニル基で置換されているか置換されていない基である。またフェニル基も適しており、それは、置換されていな

くともよいが好ましくは、1 つ以上のハロゲンまたはニトロ、アルコキシ、カルボキシ若しくはアルコキシカルボニル基で置換される。更にメトキシカルボニルのようなアルコキシカルボニル基も適している。

「アルキル」および「アルコキシ」という語は炭素数 5 以下のものを指す。

「アルキレン」という語は、炭素数 10 までの直鎖または分枝の飽和脂肪族基を指すが、それらはアルコキシカルボニル基のような 1 つ以上の不活性官能基によって置換され得る。

純粋なリシンの A 領の製造は、この発明の生成物を得るために必要であるが、米国特許第 4,340,535 に記載されている。ヒト癌細胞を標的としたモノクローナル抗体の製造法は科学文献に広く記載されており、今やこれらの多くは市販品として手に入る。

抗体(または抗体断片)とリシンの A 領との化学的結合はこの発明の方法により実施でき、この方法は次の特徴を有する。

- (1) 包合体の2つの成分すなわち抗体とリシンのA鎖の各生物学的活性を保持する。
- (2) この方法で充分な再現性が得られ、また高い収率が保証される。
- (3) 得られる包合体中のリシンA鎖と抗体の比の値を調節することを可能にする。
- (4) 安定で水溶性の生成物が調製できる。

これらの特徴を有する工程の中で2つのタンパクを結合させるために1つ以上のテオール基が関与するものが好ましい。事実、これらのテオール基は、ジスルフィド結合またはテオエーテル結合を形成させるために特に適している。これらの双方は上記の一般的条件を充す。

一般に、タンパク間の結合を成功させ、特に無秩序な架橋を生じさせないために、結合させる一方のタンパクにだけにひとつまたはひとつ以上のテオール基を導入することが重要である。他方のタンパクは、 45°C を越えない温度にてテオール基と反応して安定な共有結合を形成し得る1つ以上の基

を備えているだけである。出発質として使用するタンパク P_1 および P_2 の特徴は以下で詳細に記載する。介在分子Bは好ましい分子Rから R_B と置換させることができる。これは実施例に述べる。

I. タンパク P_1

このタンパクは、どんな場合も結合に関与する1つか1つ以上のテオール基を有しているので、生じる状況はタンパク P_1 の性質に応じて異なる。

(A) 天然の状態でタンパク P_1 は、タンパク P_2 との結合に関与する1つ以上のテオール基を有している。このことは特に次のような場合に言える。すなわち、タンパク P_1 が、ペプシンの存在下で抗体を限定分解し、続いて高分子間のジスルフィド結合を還元して通常得られるような $F(ab)'$ として知られる抗体断片である場合である。このことは、タンパク P_1 がリシンのA鎖またはA鎖の誘導体である場合にもあてはまる。この場合、天然リシンの171番目のシステイ

ン残基および257番目のシステイン残基に付いている少なくとも1つのテオール基が未結合であって化学結合を生じやすい。これらすべての場合において、天然のテオアルキル基を有するタンパク P_1 はこのような状態で結合工程に使用される。

(B) 天然の状態でタンパク P_1 は、タンパク P_2 との結合に関与するテオール基を有していない。このことは特に次のような場合に言える。すなわち、タンパク P_1 が天然の免疫グロブリンであって、抗体全体か抗体の断片特に通常 $F(ab)'$ または $F(ab)$ と呼ばれる断片の1つである場合。天然の状態でタンパク P_1 が結合に関与する1つのテオール基を持たない場合のいま1つの例は、このタンパク P_1 が、2つのシステイン残基それぞれがアルキル化により保護されているか、または化学修飾を受けないリシンのA鎖である場合である。全ての場合において、結合を可能にする1つ以上のテオール基をそのような分子に導入することが妥当といえる。

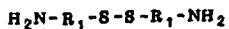
3つの型の反応がテオール基を導入するため好ましく用いられる。

(i) 最初の型の反応は、S-アセチルメルカトコハク酸無水物との反応である。この酸無水物は、タンパクのアミノ基のアセチル化を可能にする。その後当該テオール基をヒドロキシアミンと反応させることによってアセチル保護基を除くことができる。この方法はすでにアーティーズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス (Archives of Biochemistry and Biophysics)、119, 41-49 (1967) に記載されている。このように保護基が導入されたテオール基を曉いて活性型ジスルフィド基と反応させる場合、ヒドロキシアミンによって前もって保護基をはずさなくて済む可能性がある。事実、この発明の物質を形成する反応体を使ってジスルフィド結合を形成する反応は、遊離テオール基を使った場合と同様にS-アセチル基を使っても生じる。

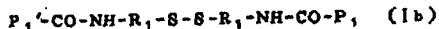
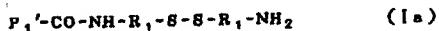
文献に記載されている他の方法も、修飾され

るタンパクにチオール基を導入するために使うことができる。

(2) 第2の型の反応はタンパクをカルボキシル基を介して以下に示すジスルフィド結合を有する対称的なジアミノ分子と反応させることである。

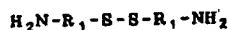


上式中、 R_1 は炭素数2から5の脂肪族原子団である。この反応では、カルボジイミド特に1-エチル-3ジメタルアミノプロピル-3-カルボジイミドのような水溶性の誘導体の如きカップリング剤の存在下でシスタミン [$\text{R}_1=-(\text{CH}_2)_2-$] と反応させ、用いた化学量論量に応じて次に示す誘導体の1つか双方の混合物を形成させるとが好ましい。



この型の反応生成物は次の2つの工程のいずれかに供される。

を使うことである。この糖鎖単位は天然の状態で抗体に存在しているものである。統いてタンパクは、糖鎖単位にアルデヒド基を生じさせるために過ヨウ素酸で酸化される。過剰のエチレングリコールを加えて反応を停止させ、副産物と過剰の反応体を透析により除いた後、得られた成生物を次の一般式を有する対称なジアミノ分子で処理する。



上式中 R_1 は炭素数2ないし5の脂肪族基である。得られた付加生成物は、統いて金属水素化物（特に、水素化ホウ素ナトリウム）との反応により第2または第3アミンに還元される。この反応はシスタミン [$\text{R}_1=-(\text{CH}_2)_2-$] を用いて実施することが好ましく、用いた化学量論量に応じて次式の誘導体の1方かその両方の混合物が形成される。

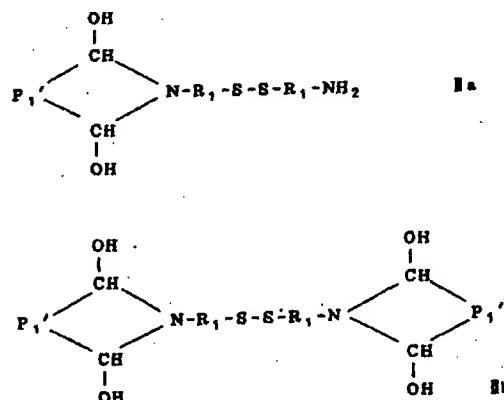
(b) 式 Ia または Ib において、タンパク P_1 がリシンの Δ 鎮またはその誘導体の1種ならば、得られた反応溶液は分別せずに2-メルカプトエタノールのような還元剤との反応に供せられる。それによって次式の1種類のタンパク誘導体が得られる。



こうして得られた生成物は統いて透析かゲル通過により精製される。

(c) 式 Ia および Ib において、ラジカル P_1' が抗体またはその断片の1種から成る、タンパク P のラジカルならば、得られた反応溶液はそのままカップリングに用いられ、その場合チオール/ジスルフィド交換法が用いられる。この交換法は、例えばヤリランド (Gillard) とコリエール (Collie) によってキャンサー・リサーチ (Cancer Research), 40, 3564 (1980) に記載されている。

(d) 第3の反応は、導入しようとするチオールを有するラジカルを固定するために糖鎖単位



得られた反応液を、 Ia または Ib の構造式で表わされる生成物であって P_1' が抗体または抗体断片であるものに関して上記した通りの処理を行なってもよい。

チオール基を人工的に導入（対称なジアミノジスルフィド反応体を使うタイプ）するための上に述べた後二者の反応において、タンパク P_1 は遊離 SH 基または遊離アミノ基を持たないこ

とが好きらしい。A鎖とその誘導体の場合には、N-エチルマレイミドまたはヨード酢酸のようなチオール基に対する過の試薬との反応により天然のチオール基をアルキル化し、およびミーンズ(MEANS)およびフィーニー(FEEENEY)によってバイオケミストリー(Biochemistry)7,2182(1968)に記載された還元的メチル化法に従って天然のNH₂基をメチル化することにより常に遊離のチオール基を持たなくさせ得る。このようにして天然リシンのA鎖に1モル当たり6個までのメチル基を導入することができる。このようにして修飾されたタンパクには、生物学的な特性(特に、真核細胞のリポソームにおけるタンパク合成を阻害する能力)が備わっている。抗体または抗体断片さらに第1群のすべての物質の場合には、前記したようにそれらは天然の遊離SH基を持たないので、還元的メチル化を例えればミーンズおよびフィーニーの方法により実施するほうがよい。このようにして通常抗体1モル当たり数十のメチル基を導入すること

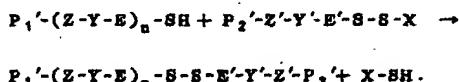
ができる。その場合抗体の細胞膜面上の抗原を認識する能力を変化させない。

I タンパクP₂

あらゆる場合、このタンパクは、タンパクP₁のチオール基と反応してジスルフィドまたはチオエーテル結合を形成し得る1つ以上の官能基を有するタンパクである。これらの官能基は、常にタンパクP₂に人工的に導入されるが、それがジスルフィド結合によりカップリングされるのかチオエーテル結合によりカップリングされるのかに応じて異なっている。具体的には以下に記載する。

(1) ジスルフィド結合

この場合、包合体の調製は以下の式で表わされる。



活性イオウ原子により置換されるタンパクP₂は、タンパクP₂または適切に保護されたタンパク

P₂からそれ自体活性イオウ原子を有する試薬による置換により得られる。これは次の式で示される。



上式中、P₂'は置換されるべきタンパクを示し、L-Y'は試薬をタンパクに共有結合させる基を示す。官能基L-Y'は、置換されるべきタンパクの構成アミノ酸の側鎖に付いているいずれか1つの基と共有結合し得る基である。これらの基の中で、特に次のものが選び出せる。

(a) ベブチド鎖の末端アミノ基またはタンパクに含まれるリシン残基のアミノ基。この場合、L-Y'は特に次のように表わせる。

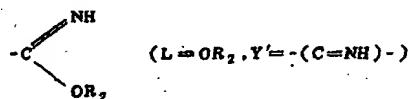
・カルボジイミド、特に1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミドの如き水溶性誘導体のようなカップリング剤の存在下でタンパクのアミノ基と結合し得るカルボキシル基。

・アミノ基と直接反応して、それをアシル化し得るカルボン酸塩化物。

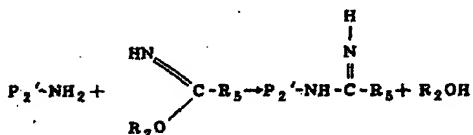
・オルト-またはパラ-ニトロフェニルまたは-ジニトロフェニルエステル、またはN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルのようないわゆる「活性型」エステル。これはアミノ基と直鎖反応して、それをアシル化し得る。

・コハク酸無水物のようなジカルボン酸の内部無水物。これはアミノ基と自然に反応して、アミド結合を形成させる。または

・1,ミドエステル基



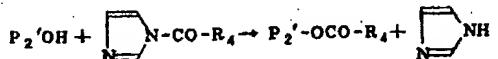
上式中、R₂はアルキル基で、次式のようにタンパクP₂のアミノ基と反応する。



上式中、R₃は-R-S-S-X基を示す。

(b) タンパクに含まれるチロシン残基のフェ

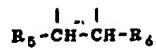
ノール基。この場合、L-Y'は特にイミダゾール-1-イルカルボニル基を示すことがある。それは次の式に従ってタンパクのフェノール基と反応する。



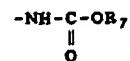
上式中、Lがイミダゾール-1-イルで、Y'がCO基で、R₄が-R-S-S-X基である。-S-S-Xは遊離チオール基と反応し得る活性型ジスルフィドを示す。特に、このジスルフィドにおいて、Xは1つ以上のアルキル、ハロゲンまたはカルボキシ基で置換されていることのあるピリジン-2-イルまたはピリジン-4-イル基を指すことがある。Xもまた1つ以上のフェニル基またはカルボキシル基で好ましくは置換されているフェノール基を指すことがある。またはXはメトキシカルボニル基のようなアルコキシカルボニル基を指すこともある。

R基は、置換基Y'およびS-S-Xを同時に結合

し得る介在分子（前式中のEのような）を示す。それは、後の反応において、使用される反応物質と合成される生成物を防ぐするような基を含まないようなものでなければならない。特に、R基は-(CH₂)_n-でもあり得（nは1ないし10）、また次の基でもあり得る。



上式中、R₆は水素または炭素数1ないし8のアルキル基を指し、R₅は統いて使われる次式のカルカルバメイト基のような反応体に不活性な置換基を指す。



上式中、R₇は炭素数1から5の直鎖または分枝アルキル基、特に第3アセチル基を示す。化合物L-Y'-R-S-S-XとタンパクP₂との反応は均質な液相、最も一般的には水または緩衝液中で進行する。反応体の溶解性を高めるには、水に可溶性の有機溶媒を反応溶液に加えることができる。

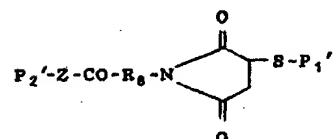
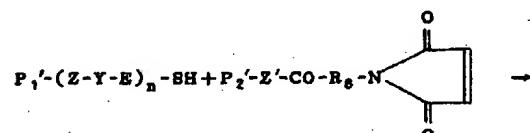
その最終濃度を、第3ブタノールのような第3アルコールの場合には容量比で20%までにすることができ、ジメチルホルムアミドまたはテトラヒドロフランの場合には容量比で10%までにすることができる。

反応を、室温にて数分から数時間の時間をかけて実施する。その後、低分子量の生成物および時には過剰の反応体を透析またはゲル通過によって除去することができる。この方法により、タンパク1モルあたり1ないし1.5の置換基を導入することが可能となる。そのような化合物を用いる場合、タンパクP₁とのカップリングは、pH 6から8の溶液中にて30℃を越えない温度で、1時間から24時間かけておこなう。低分子量の生成物を除くために適宜、得られた水溶液を透析する。ついで包合体を既知の方法の変法により精製できる。

(2) チオエーテル結合

この場合、包合体をP₁'-(Z-Y-B)_n-SHと前もって1つ以上のマレイミド基を導入しておいた

タンパクP₂とを反応させることにより調製する。1例として、反応を次の式で示す。

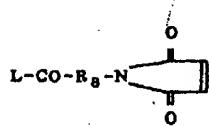


上式中、 R_8 は炭素数 1 ないし 15 の脂肪族または芳香族介在分子を示す。それは、統いて使用される反応体に対して不活性である。 β は、結合に関与するタンパク P_2 の官能基の種類に従って変化し得る基を示す。すなわち、 β は、酸素(テロシン残基(テロシル基)のフェノール基のエステルの場合)、NH(タンパクのアミノ基と活性型カルボキシル基のカップリングの場合)または NH-CH₂(タンパクのアミノ基とクロロメチルケトンの場合)である。

マレイミドで置換されたタンパク P_2 は、それ自体マレイミド基を有する試薬によってタンパク P_2 自体からまたは適当に保護されたタンパク P_2 から得られる。これらに適した基のうち、特に次のものが選ばれる。

a) ペプチド鎖の末端アミノ基またはタンパクに含まれるリシン残基(リシル基)の側鎖アミノ基。この場合、マレイミド基を有する試薬は次のようなものがある。

ア) 次の一式の試薬



上式中、L-CO- は次の通りである。

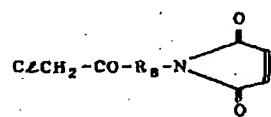
○ カルボキシル基。その場合、カルボジイミドのようなカップリング剤および等には 1-エチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミドのような水溶性誘導体の存在下でカルボキシル基を活性化したのち、反応が進行する。

○ またはオルト-若しくはパラ-ニトロフェニルまたはジニトロフェニルエステルまたは N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル。

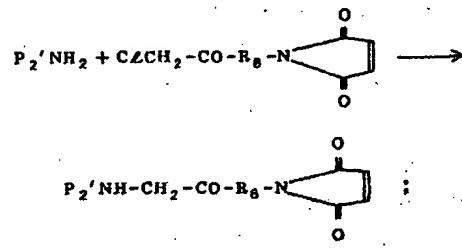
これは直接アミノ基と反応し、それをアシル化する。このような試薬の調製は、特にヘルベティカ・ケミカ・アクタ (Helvetica Chimica Acta), 58, 531-541 (1975) に記載されている。同じようなクラスの他の薬剤は市販品

として手に入る。

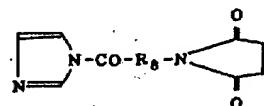
イ) 次の一式の試薬



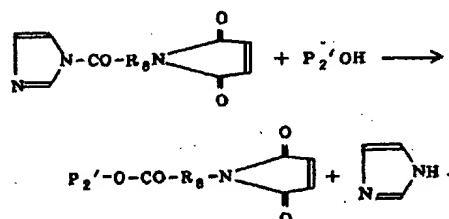
これは次の反応式に従ってタンパク P_2 のアミノ基と反応し得る。



b) タンパクに含まれるテロシン残基のフェノール基。この場合、マレイミド基を有する試薬は次の一般式で示される。



これは次の反応式に従ってタンパクのフェノール基と反応する。



マレイミドを有する試薬とタンパク P_2 との反応は均質な液相、最も一般的には水または緩衝液中で進行する。反応体の溶解性を高めるには、水に可溶性の有機溶媒を反応溶液に加えることができる。その最終濃度を、第 3 ナタノールのようない第 3 アルコールの場合には容量比で 2.0 %までにすることができる。ジメチルホルムアミ

ドまたはテトラヒドロフランの合には容積比で10倍までにすることができる。反応は室温にて数分から数時間かけておこなう。そのような化合物を使うと、タンパクP₁とのカップリングは、pHないし8の水溶液中にて30度を超えない温度で1時間ないし24時間かけて、2つのタンパクを混合することによっておこなわれる。得られた溶液を低分子量の生成物を除くため適宜透析し、続いて包合体を既知の様々な方法により精製できる。

この発明の化合物のうち、特に適したものとして、式Ⅱの化合物が挙げられる。その場合、W'は前記の原子団(a)、(b)、(c)および(d)の中の1つを示し、その中でEおよびE'は-(CH₂)_p-基(pは2ないし7の整数)およびCH-CH₂COOH基を示す。

また、別の観点に立つと、この発明は次の一般式を有する新規な生成物に関する。



上式中、P₂''は次の(a)、(b)から選ばれるタンパ

クのラジカルを示す。

(a) 抗体または抗体断片、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片、または官能基のどれか1つを人工的に修飾させることによりこれらの分子から由来する分子。

(b) リシンのA鎖または官能基のどれか1つを人工的に修飾させることによりこれらの分子から由来する分子。前記タンパクの一部から除かれたチロシンのフェノール性水酸基の1つ以上は上記ラジカルから除去されている。

○ 水酸基は、タンパクのラジカルP₂''から欠失するフェノール性水酸基に属するもの。

○ EおよびGは前記に定義したとおり。

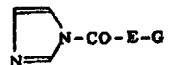
式Ⅳで表わされる化合物が特に好ましい。この場合、その式中のEは-(CH₂)_p-基(pは2ないし7の整数)または-CH-CH₂COOH基を示す。またGは-B-S-X構造の基(Xは、1つ以上のハロゲンまたはアルキル基、カルボキシル基若しくはアルコキシカルボニル基で置換されているか置換されていないピリジン-2-イルおよび

ピリジン-4-イル基; 1つ以上のハロゲンまたはニトロ基、アルコキシル基、カルボキシル基若しくはアルコキシカルボニル基で置換されているか置換されていないフェニル基; またはアルコキシカルボニル基から選ばれる活性基)である。

式Ⅳの生成物は次式の生成物とそのまた下に示すVI式の化合物とを反応させて得られる。



上式中、R₂''は上述したとおりであり、水酸基はP₂''のチロシンから欠失するフェノール性水酸基を示す。



VI

上式中、EおよびGは上記に記したとおりである。反応は、10ないし40℃の温度でジオキサンまたはテトラヒドロフランの如きエーテル溶媒のような水に可溶性の有機溶媒を任意に含む水溶性溶媒中にて行なう。

次に示す実施例により、この発明がよりはっきりと分かるであろう。しかしこの発明の範囲はこれに限定されない。すべての実施例において、記載される包合体の調製法は、米国特許第4,340,535号に記載されている方法により得られたような天然型のリシンのA鎖を用いたものである。

これら実施例では次のような抗体が使用される。

- ヒトTリンパ球や多種ヒトTリンパ系白血病細胞上に存在する抗原T65に対するモノクローナル抗体T101。この抗体は、ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology), 125(2), 725-727(1980)に記載されている。これは、ハイブリテク社(HYBRITECH Inc.) (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ)から入手できる。
- マウスリンパ球上の Thy 1.2 抗原に効するモノクローナル抗体AT15E。この抗体は、ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of

Immunology), 122, 2491-2498 (1981)に記載されているものであり、ハイブリドーマ (Hybridoma), 1(1), 13-17 (1981)に記載のハイブリドーマから得られる。

○ 抗-DNPモノクローナル抗体。

[実施例]

実施例1

P_1 は、カルボキシルを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

P_2 はアミンを介して導入された活性型ジスルフィド基のあるT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミドによる天然オール基の保護

リシンA鎖の濃度8mg/mlの水溶液1.5ml (A鎖4.1マイクロモル)を終濃度1%となるようIC2-メルカプトエタノールの水溶液で処理した。その水溶液を1時間静置し、続いてpH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(300ml/時の速さで20時間)に透析して除いた。この結果、リシンA鎖濃度7mg/mlの溶液1.3mlを得た。これには、エルマンの試薬で測定し得るオール基はもはや存在しなかった。このようにして得られた生成物を以後A鎖(NEM)と呼ぶ。

ンの方法 [メソド・イン・エンザイモロジー (Method in Enzymology), 25, 457 (1972)]

を用いるとリシンA鎖1モル当りSHは0.9当量であった。このSH基をメソド・イン・エンザイモロジー, 11, 541 (1967)に記載の方法によりN-エチルマレイミドで保護した。この際、前段階で得られたリシンA鎖を、A鎖1モル当り2.0当量のN-エチルマレイミドの存在下で30℃にて2時間インキュベートした。過剰の試薬をpH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(500ml/時の速さで20時間)に透析して除いた。この結果、リシンA鎖濃度7mg/mlの溶液1.3mlを得た。これには、エルマンの試薬で測定し得るオール基はもはや存在しなかった。このようにして得られた生成物を以後A鎖(NEM)と呼ぶ。

2) カルボキシル基の修飾

システミン塩酸塩1.95ミリモルおよび1-Eチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミドの1M水溶液390mlを、A鎖

(NEM)4.0mg(1.33ミクロモル)を溶かした125mMリン酸緩衝液に加えた。溶液のpHを1N塩酸で5.4に調節した。反応を20℃にて2時間進行させ、続いて酢酸ナトリウムの1M水溶液750mlを添加して停止させた。そして反応溶液をpH7の125mMリン酸緩衝液で連続的(300ml/時の速さで20時間)に透析して精製した。続いてタンパクに付いているシステミンのジスルフィド結合を、2-メルカプトエタノールで還元した(最終濃度3%)、30℃にて1時間)。続くpH7の125mMリン酸緩衝液に対しての透析は上記のとおり続けた。透心後、修飾されたA鎖(NEM)(濃度1.75mg/ml)の溶液を得た。この生成物をエルマンの方法で測定したところ、タンパク1分子当たりのSH基は0.7であった。濃度勾配ポリアクリルアミド電気泳動により調べたところ、この修飾されたA鎖(NEM)は、単一バンドとして現われ、分子量は約30,000であった。

(B) 修飾抗体の調製

3-(ビリジン-2-イルジスルファニル)プロピオン酸1.1mgを含む水溶液を前もって第3アタノールに溶かし、それと1-Eチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミド6.5mgを、T101抗体濃度1.0mg/mlの溶液2.5ml(抗体1.68ミリモル)に加えた。この混合物を30℃にて15分間攪拌し、続いてpH7.0のリシン酸緩衝液に対して連続的(500ml/時の速さで40時間)に透析した。透析後、タンパク溶液を透心し、1ml当たり1.0.3mgの修飾抗体を含む溶液24.5mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるビリジン-2-チオンを343nmで分光分析したところ、得られた抗体は1分子当たり1.7個の活性型ジスルフィド基を有することが分かった。

(C) 免疫毒素の調製

上記で得た修飾A鎖(NEM)の溶液7.5ml(0.44ミクロモル)を上記で得た活性型抗体の溶液1.75ml(0.12ミクロモル)に加え、

その混合物を30℃にて3時間インキュベートした。その溶液を遠心し、そしてセファデックG100をつめたカラムでゲル通過して精製した(溶出液の光学的濃度は280 nmで測定した)。抗体とA鎖両方を含む画分を集めると、濃度0.51 mg/mlの免疫毒素溶液3.1 ml(1.5.8 mg)を得た。この溶液は、1 ml当たり抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.125 mg含んでいた。従って、この調製液のカップリングの程度は、抗体1分子当たり1.6 A鎖(NEM)であった。

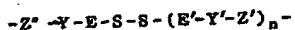
この結果、式Ⅰの免疫毒素が得られた。

この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンのA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

Wは次式で示される原子团。



上式中、

の調製のため、および¹⁴C-フェニルアラニンの取り込みの測定のために使用した方法は、バイオケミカ・バイオフィジカ・アクタ(Biochemical-Biophysica Acta), 312, 608-615(1973)に記載された方法を応用したものである。それには、ミクロゾーム画分と細胞質画分の両方を用いた。A鎖を含む試料を、pH 7.6の5.0 mMトリス塩酸緩衝液(0.2 molの2-メルカプトエタノールおよび1.5 mg/mlのウシ血清アルブミンを含む)中に導入した。得られた計数を計算(阻害剤を含まない対照溶液を比較として)し、リシンA鎖を含む各反応溶液に対してタンパクへの¹⁴C-フェニルアラニンの取り込みの阻害率を求めた。これらの値から、この実験条件下で¹⁴C-フェニルアラニンの取り込みを50%阻害するリシンA鎖の濃度(IC_{50})を求めることができた。

2) 有細胞系(テスト-2)

この試験では、培養細胞中への¹⁴C-ロイシンの取り込みを測って、その物質の効果を調べ

- Z'は-CO-
- Y'は-NH-
- Eは-CH₂CH₂-
- E'は-CH₂CH₂-
- Y'は-CO-
- Z'は-NH-
- nは1。

(D) 免疫毒素活性試験

60.8リットルソームサブユニットを分解することによって、真核細胞のタンパク合成を阻害することが、リシンA鎖の基本的な生物学的特性である。従って、無細胞系(テスト-1)または有細胞系(テスト-2)でタンパク合成の阻害を調べる試験を行なった。

1) 無細胞系(テスト-1)

この生体外の実験法においては、適当に改良したラット肝の細胞レベル以下の画分であって人工メッセンジャーRNA(ポリウリジル酸)の存在下で¹⁴C-フェニルアラニンを吸込むことができるものを用いた。細胞レベル以下の画分

た。使用した細胞は、免疫毒素を調製するために選ばれた抗体の特異性に依存した。この実施例では、通常T65抗原を有するCEMヒトリンや芽球様の細胞を使用した。この細胞を、測定すべき物質の製剤の存在下でインキュベートした。そして、インキュベーションを終えてから、その細胞が¹⁴C-ロイシンをどの程度吸込むかを調べた。この測定に使用した手法は、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 24901, 3557-3562(1974)に記載の方法を応用したものである。すなわちトレーサーとして¹⁴C-ロイシンを用い、タンパク合成の強度を測定した。吸込まれた放射線活性は、ここではゲル通過で単離した完全な細胞に関して測定した。この方法に基づくと、投与量-作用曲線(横軸に被験物質の濃度を取り、縦軸に被験物質存在下で対照細胞の¹⁴C-ロイシンの取り込みに対するパーセントで表わした¹⁴C-ロイシンの取り込みを取る)を作製することができる。このようにして、各被験物

特開昭61-12630(17)

質に対して、 ^{14}C -ロイシンの取り込みを50%一セント阻害する濃度すなわち「50%阻害濃度」(IC_{50})を求めることができる。完全細胞の ^{14}C -ロイシンの取り込みを測定すれば、従来のタンパク合成の測定法によって得られる結果と一致する IC_{50} を決定できることも調べた。

3) 結果

a. テスト-1(無細胞系)

修飾A鎖の阻害活性を測定した。 IC_{50} は 2.18×10^{-10} モル/ ml となった。この実験で対照A鎖の IC_{50} は 1.03×10^{-10} モル/ ml であった。従って、修飾してもA鎖の活性はあまり減少しない。

b. テスト-2(有細胞系)

そのままで抗原T65を有するCEM細胞について、この試験を行なった。包合体の細胞毒性は著しかった(IC_{50} は約 10^{-9} moL/ ml)。A鎖の値(同一操作条件で IC_{50} は 5×10^{-8})より50倍高かった。 1mM 塩化アンモニウムの存在下では包合体の細胞毒性効果は更に増大

($\text{IC}_{50} = 2 \times 10^{-12}$ moL/ ml)した。このようにこの細胞毒活性は、A鎖のそれよりも25,000倍高い。

実施例2

P₁は、カルボキシを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

P₂は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

実施例1と同じ。

(B) 修飾抗体の調製

1-Eチル-3-ジメチルアミノプロピル-3-カルボジイミド8.8mgとマレイミドカプロン酸11mgを含む溶液を、前もって25°Cにて15分間インキュベートし、濃度10mg/mlのT101抗体溶液1.0ml(0.67マイクロモル)に加えた。その混合物を30°Cにて3時間攪拌し、4°Cにて40時間pH7の125mMリン酸緩衝液に対して連続的(5.00ml/時)透析した。この結果、1ml当たり5.28mgの修飾抗体を含む

溶液18.5mlを得た。 ^{14}C -シテインによりマレイミド基を測定したところ、得られた抗体は1分子当たり2.8個の活性基を有することが分った。

(C) 免疫毒素の調製

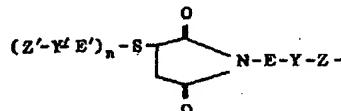
修飾されたリシンA鎖溶液7.5ml(0.44マイクロモル)を、上記で得られた活性型抗体の溶液3ml(0.11マイクロモル)に加えた。統いて、その混合物を30°Cにて1時間静置した。残りのマレイミド基を5.8マイクロモルのシスティンを添加して保護した。30°Cにて1時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度0.35mg/mlの免疫毒素溶液3.9ml(13.7mg)を得た。この溶液は、1ml当たり抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.10mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体1分子当たりA鎖(NEM)2.1であった。

この結果、前記1式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-Eチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z'は-CO-
- ・ Y'は-NH-
- ・ E'は-CH₂CH₂-
- ・ Eは-(CH₂)₆-
- ・ Yは-CO-
- ・ Zは-NH-
- ・ nは1。

(D) 活性試験

a. テスト-1(無細胞系): 実施例1に同

じ。

b. テスト-2(有細胞系)：実施例1と同じ条件では、活性剤(1.0 mM塩化アンモニウム)存在下の IC_{50} は 2×10^{-11} モル/ μ Lであった。このことは、この包合体の細胞毒活性がA鎖のそれ(同じ実験で IC_{50} は 5×10^{-8})より2,500倍高いことを示している。

実施例3

P_1 は、アミンを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

P_2 は、アミンを介して導入された活性ジスルフィド基を有するT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミド保護: 実施例1と同じ。

2) アミンの修飾

ジメチルホルムアミド(DMF)1 mL当たりS-アセチルノルカブトコハク酸(SAMSA)74 mgを含むDMF溶液5.0 mLを、pH7の1.25 mMリン酸緩衝液にA鎖(NEM)を溶かした溶液2.5 mL

(1.7 mg)を得た。この溶液は、1 mL当たり抗体とカップリングした修飾A鎖(NEM)0.130 mgを含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗体1分子当たりA鎖(NEM)1.1であった。

この結果、前記Ⅱ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団



上式中、

・ Y'は -CO-

・ E'は -CH-



・ Eは -CH₂-CH₂-

・ Yは -C -

・ Zは -NH-

・ nは 1。

(0.75 マイクロモル)に加えた。2時間インキュベートし、続いて過剰の試薬を除去するためにpH7の1.25 mMリン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、濃度7.75 mg/mLの溶液2.6 mLを得た。ヒドロキシアミンとの反応により遊離したSH基を分光測定法で解析したところ、得られた修飾A鎖(NEM)は1分子当たり1.4個のSH基を有していることが分った。

(B) 修飾抗体の調製

実施例1 IC同じ。

(C) 免疫毒素の調製

修飾されたリシンA鎖溶液1.2 mL(0.81 マイクロモル)を、ヒドロキシアミン塩酸塩の1 M溶液35.0 μL存在下にて、上記で得られた活性型抗体の溶液2.3 mL(0.160 マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を30°Cにて5時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例1に記載した方法通りセファックスG100を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度0.71 mg/mLの免疫毒素溶液2.4 mL

(D) 活性試験

a. テスト-1(無細胞系)

修飾されたA鎖の阻害活性を測定した。 IC_{50} は 1.95×10^{-10} モル/ μ Lであった。この実験で、対照のA鎖のICは 1.5×10^{-10} モル/ μ Lであった。この結果から、修飾したからといってA鎖の活性が著しく減少するわけではなかった。

b. テスト-2(有細胞系)

実施例1と同じ条件では、活性剤(1.0 mM塩化アンモニウム)存在下の IC_{50} は 1.6×10^{-11} モル/ μ Lであった。このことは、この包合体の細胞毒活性がA鎖のそれ(同じ実験で IC_{50} は 2.2×10^{-7})より4,000倍高いことを示している。セオングジン(50 nM)存在下では、この免疫毒素の IC_{50} は 10^{-15} であった。

実施例4

P_1 は、アミンを介して導入されたSH基を有するリシンA鎖。

P_2 は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

(A) 適切な官能基が導入されたリシン4類の調製

実施例3と同じ。

(B) 特異抗体の調製

実施例2と同じ

(C) 免疫毒素の調製

修飾されたリシン A 鎌溶液 1.2 ml (0.31 マイクロモル) を、ヒドロキシアミン塩酸塩の 1 M 溶液 350 μl 存在下にて、上記で得られた活性型抗体の溶液 3.5 ml (0.12 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30 ℃ にて 1 時間インクベートした。残りのマレイミド基を 6.9 マイクロモルのシスティンを添加して保護した。30 ℃ にて 1 時間インキュベートした。この反応溶液を、実施例 1 に記載した方法通りセファデックス G 100 を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度 0.51 mg/ml の免疫毒素溶液 3.0 ml (1.5.2 倍) を得た。この溶液は、1 ml 当り抗体とカップリングした修飾 A 鎌 (NEM) 0.08 nmol を含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗

(D) 活性試驗

a. テスト - 1 (無細胞系)

実施例3と同じ。

b. テスト - 2 (有細胞系)

実施例1と同じ条件では、活性剤(50 mMモネンジン)存在下のIC₅₀は 3.3×10^{-12} モル/Lであった。このことは、この包合体の細胞毒活性がA鎖のそれより8,000倍高いことを示している。

实施例5

P₁は、アミンを介して導入されたSH基を有する抗DNP抗体。

P₂は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有するリシンのA鎖。

(A) カップリング試薬の調製

カッピング試薬の調製は、マレイミドカブロン酸を2-フェニル-1-アミノエチルクロロメチルケトンで収縮して実施した。

体 1 分子当たり A 頭 (NEM) 1 であった。

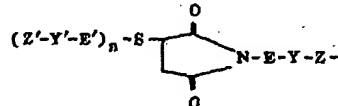
この結果、前記ノ式の免疫 素が得られた。

この式中で、

A'は、SH基がN-エチルマレイミドで保護されたリシンA鎖のラジカル。

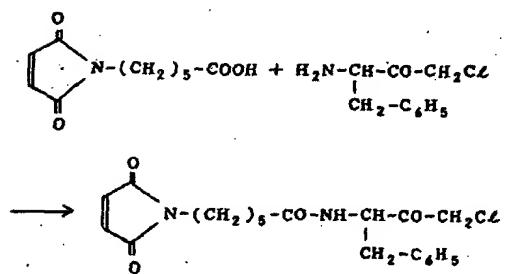
P'は、T101抗体のラジカル。および、

w は、次の式で示される原子団。



上式中、

- Z' H_2 -NH-
 - Y' H_2 -CO-
 - E' H_2 -CH-
 - CH₂COOH
 - B H_2 -(CH₂)₆-
 - Y H_2 -CO-
 - Z H_2 -NH-
 - a H_2 1.



レ.レイミドカプロン酸(1当量)を、メチルクロロフォルメイト(1.1当量)とN-エチルモルフォリン(1.1当量)存在下にてテトラヒドロフラン(THF)に溶解した。この混合物を-30℃にて5時間静置した。冷THFに移しかした2-フェニル-1-アミノエチルクロロメチルケトンおよびN-エチルモルフォリン(1.1当量)を徐々に加えた。4℃にて1時間静置して反応を進行させ、更に室温にて3時間反応を進行させた。続いて、反応溶液を漏過し、その濁液を真空中で蒸発乾固させた。残渣を酢酸エチルに再溶解させた。その有機層を水で2回抽

出し、 $MgSO_4$ 上で乾燥し、蒸発乾固させた。結晶化しない生成物が得られるが、それを NMR スペクトル分析法により同定した。

(b) 適切な官能基が導入されたリシン A 鎮の調製

1) N-エチルマレイミドによる保護

実施例 1 と同じ。

2) リシン A 鎮のアミンの修飾

THF に溶解したカッピング試薬 4.0 マイクロモルを、8 毫 (0.26 マイクロモル) の A 鎮 (NEM) を pH 7 の 1.25 mM のリン酸緩衝液 1.0 mL に溶かした溶液に加えた。反応溶液を 25 ℃ にて 5 時間静置した。過剰の試薬を除くために pH 7 の 1.25 mM リン酸緩衝液に対して透析して精製し、遠心した。 ^{14}C -システィンによりマレイミド基を測定したところ、得られた修飾 A 鎮 (NEM) は 1 分子当たり 0.5 個の活性基を有していることが分った。

(c) 修飾抗体の調製

DMF に濃度 1.40 mg/mL となるように溶かした SAMSA の DMF 溶液 20 μ L を、濃度 1.0 mg/mL の

T 101 抗体溶液 4 mL (0.3 マイクロモル) に加えた。その混合物を 4 ℃ にて 2 時間攪拌し、続いて試薬を除くために 24 時間 pH 7 の 1.25 mM リン酸緩衝液に対して透析的 (400 mL/時で 20 時間) に透析し、精製した。この結果、1 mL 当り 8.6 毫の修飾抗体を含む溶液 4.1 mL を得た。ヒドロキシアミンによる反応後、エルマンの方法により遊離した SH 基を分光測定法で解析したところ、得られた抗体は 1 分子当たり 3.5 個の SH 基を有していることが分った。

(d) 免疫毒素の調製

修飾されたリシン A 鎮溶液 0.5 mL (0.007 マイクロモル) を、上記で得られた活性型抗体の溶液 5.3 mL (0.003 マイクロモル) に加えた。ヒドロキシアミン塩酸塩の 1.0 M 溶液 1.0 mL をこの反応溶液に加えた。25 ℃ にて 10 時間静置して反応させた。濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べたところ免疫毒素が検出された。

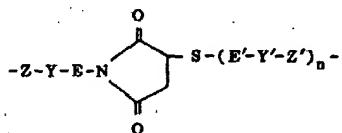
この結果、前記 (b) 式の免疫毒素が得られた。

この式中で、

A' は、SH 基が N-エチルマレイミドで保護されたリシン A 鎮のラジカル。

P' は、抗 DNP 抗体のラジカル。および、

W' は、次の式で示される原子団。



上式中、

- Z は -NH-
- Y は -CO-
- E は -(CH₂)₆-
- E' は -CH-
|
CH₂COOH
- Y' は -CO-
- Z' は -NH-
- n は 1。

(e) 活性試験

a. テスト - 1 (無細胞系)

修飾された A 鎮の阻害活性を測定した。IC₅₀ は 0.25×10^{-10} モル/L であった。この実験で、対照の A 鎮の IC₅₀ は 0.78×10^{-10} モル/L であった。この結果から、修飾しても A 鎮の活性は全く減少しなかった。

b. テスト - 2 (有細胞系)

実施例 1 と次の点以外同じ条件下で試験を実施した。フランス特許第 78/27838 号に記載の方法に従って TNP で標識した CEM 細胞を用いた。その方法は、ヒーラ細胞を TNP で標識する技法と類似している。活性剤 (1.0 mM 塩化アンモニウム) 存在下での IC₅₀ は 1×10^{-10} モル/L であった。この値は、A 鎮のそれより 10 倍高かった。

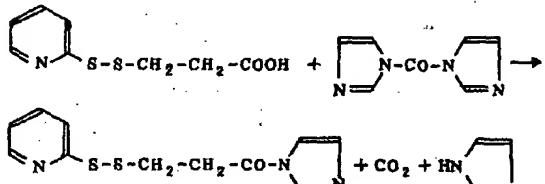
実施例 6

P₁ は、アミンを介して導入された SH 基を有する T 101 抗体。

P₂ は、チロシンの水酸基を介して導入された活性型ジスルフィド基を有するリシンの A 鎮。

(A) カップリング試薬の調製

カップリング試薬には、3-(ピリジン-2-イミドスルファンフェニル)プロピオニ酸(PDPA)から誘導したイミダゾリドを用いた。このイミダゾリドは PDPA とカルボジイミダゾール(CDI)とから 1 工程で得られた。



PDPA 4.30 mmol を THF 2 ml に溶解した。 CDI 4.05 mmol をこの溶液に加えた。この混合物を、25°C にて 1.5 分間攪拌したところ炭酸ガスが発生した。この反応溶液を精製せずに直接受けた。この結果、タングステン酸濃度 1.65 mg/ml の修飾 A 鎮溶液 9.5 ml を得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるピリジン-2-チオウムを 343 nm にて分光測定法で解析したところ、得られた修飾 A 鎮(NEM)は 1 分子当たり 1.6 個の活性基を有していることが分った。

(B) 適切な官能基が導入されたリシン A 鎮の調製

1) N-エチルマレイミドによる保護

実施例 1 と同じ。

リン酸緩衝液に対して連続的(400 ml/時)透析し、精製した。この結果、1 ml 当り 8.6 mg の修飾抗体を含む溶液 4.1 ml を得た。ヒドロキシアミン塩酸塩の 0.5 M 溶液 0.64 ml をこの抗体溶液に加えた。30°C にて 1 時間インキュベーションしたのち、試薬を除くために 24 時間 pH 7 の 1.25 mM リン酸緩衝液に対して透析し、精製した。エルマンの方法により遊離した SH 基を分光測定法で解析したところ、得られた抗体は 1 分子当たり 5 個の活性基を有していることが分った。

(C) 免疫毒素の調製

修飾されたリシン A 鎮溶液 5.2 ml (0.27 マイクロモル) を、上記で得られた活性型抗体の溶液 2.1 ml (0.11 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30°C にて 5 時間インキュベーションした。この反応溶液を、実施例 1 に記載した方法通りセファデックス G-100 を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度 1.1 mg/ml の免疫毒素溶液 1.7 ml

2) チロシンの 鎮

THF に溶解したカップリング試薬 3.00 マイクロモルを、1.8 ml (0.6 マイクロモル) の A 鎇(NEM)を pH 7 の 1.25 mM のリン酸緩衝液 1.0 ml に溶かした溶液に滴下した。反応溶液を 25°C にて 1.5 分間攪拌した。過剰の試薬を除くために pH 7 の 1.25 mM リン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、タングステン酸濃度 1.65 mg/ml の修飾 A 鎇溶液 9.5 ml を得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されるピリジン-2-チオウムを 343 nm にて分光測定法で解析したところ、得られた修飾 A 鎮(NEM)は 1 分子当たり 1.6 個の活性基を有していることが分った。

(D) 修飾抗体の調製

DMP に濃度 1.70 mg/ml となるように溶かした SAMSA の DMP 溶液 2.5 ml を、濃度 9 mg/ml の T 10.1 抗体溶液 4.5 ml (0.3 マイクロモル) に加えた。その混合物を 4°C にて 2 時間攪拌し、続いて試薬を除くために 24 時間 pH 7 の 1.25 mM

(1.8.7 mg) を得た。この溶液は、1 ml 当り修飾された A 鎮(NEM) 0.32 mg を含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体 1 分子当たり A 鎮(NEM) 2 であった。

この結果、前記 1 式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A' は、SH 基が N-エチルマレイミドで保護されたリシン A 鎇のラジカル。

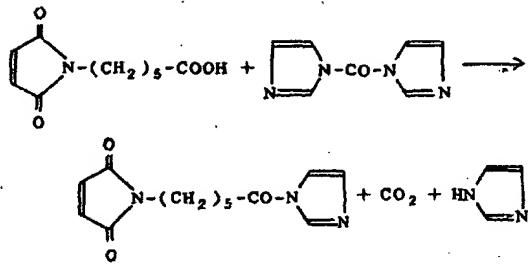
P' は、T 10.1 抗体のラジカル。および、W' は、次の式で示される原子団。



上式中、

- Y' は -CO-
- E' は -CH₂CH₂-
- E は -CH-
 |
 CH₂COOH
- Y は -CO-
- Z は -O-
- n は 1。

から誘導したイミダゾリドを用いた。このイミダゾリドはマレイミドカプロン酸とカルボジイミドから1工程で得られた。



マレイミドカプロン酸 4.22 mg を THF 2 ml に溶解した。CDI 4.05 mg をこの溶液に加えた。この混合物を、室温にて 1.5 分間攪拌したところ炭酸ガスが発生した。この反応溶液を精製せずに直接に使用した。

(B) 適切な官能基が導入されたリシンA鎖の調製

1) N-エチルマレイミドによる保護

実施例 1 と同じ。

四 活性試験

a. テスト-1 (無細胞系)

修飾された A 鎖の阻害活性を測定した。IC₅₀ は 3.6×10^{-10} モル / l であった。この実験で、対照の A 鎖の IC₅₀ は 1.2×10^{-10} モル / l であった。この結果から、修飾しても A 鎖の活性は全く減少しなかった。

b. テスト-2 (有細胞系)

実施例 2 と同じ条件下で試験を実施した。活性剤 (5.0 nM モネンシン) 存在下での IC₅₀ は 1.2×10^{-12} モル / l であった。この値は、A 鎖のそれ (IC₅₀ は 6×10^{-8} モル / l) より 5×10^4 倍高かった。

実施例 7

P₁ は、アミンを介して導入された SH 基を有する T101 抗体。

P₂ は、チロシンの水酸基を介して導入された活性型マレイミド基を有するリシンの A 鎖。

(A) カップリング試薬の調製

カップリング試薬にはマレイミドカプロン酸

2) チロシンの修飾

THF に溶解したカップリング試薬 3.00 マイクロモルを、1.8 mg (0.6 マイクロモル) の A 鎖 (NEM) を pH 7 の 1.25 mM のリン酸緩衝液 1.0 ml に落とした溶液に滴下した。反応溶液を 2.5 ℃ にて 1.5 分間攪拌した。過剰の試薬を除くために pH 7 の 1.25 mM リン酸緩衝液に対して透析して精製した。この結果、タンパク濃度 1.45 mg/ml の修飾 A 鎖溶液 2.0 ml を得た。C-システィンによるマレイミド基を測定したところ、得られた修飾 A 鎖 (NEM) は 1 分子当たり 1 個の活性基を有していることが分った。

(C) 修飾抗体の調製

実施例 6 と同じ。

(D) 免疫毒素の調製

修飾されたリシン A 鎖溶液 5.8 mg (0.28 マイクロモル) を、上記で得られた活性型抗体の溶液 2.1 ml (0.11 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30 ℃ にて 1 時間インキペーションした。残ったマレイミド基を 5 %

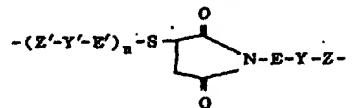
イクロモルのジステインで保護した。30 ℃ にて 1 時間インキペーションし、この反応混合物を、実施例 1 に記載した方法通りセファテックス G 100 を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度 1.05 mg/ml の免疫毒素溶液 1.95 ml (2.05 mg) を得た。この溶液は、1 mg 当り修飾された A 鎖 (NEM) 0.31 mg を含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体 1 分子当たり A 鎖 (NEM) 2 であった。

この結果、前記 1 式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A' は、SH 基が N-エチルマレイミドで保護されたリシン A 鎖のラジカル。

P' は、T101 抗体のラジカル。および、

W' は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z' は -NH-
- ・ Y' は -CO-
- ・ E' は -CH-
|
CH₂COOH
- ・ E は -CH₂-CH₂-
- ・ Y は -CO-
- ・ Z は -O-
- ・ n は 1。

(4) 活性試験

a. テスト-1 (無細胞系)

修飾された A 頭の阻害活性を測定した。IC₅₀ は 1.0×10^{-10} モル/ℓ であった。この実験で、対照の A 頭の IC₅₀ は 1.1×10^{-10} モル/ℓ であった。活性がかなり消失しているものの、修飾 A 頭のタンパク合成阻害能はまだ高かった。

b. テスト-2 (有細胞系)

実施例 1 と同じ条件下で試験を実施した。活性剤 (500 nM モネンジン) 存在下での IC₅₀ は 3×10^{-11} モル/ℓ であった。この値は、A 頭

のそれ (IC₅₀ は 6×10^{-8} モル/ℓ) より

3×10^5 倍高かった。

実施例 8

P₁ は、天然状態のリシン A 頭。

P₂ は、アミンを介して導入されたマレイミド基を有する AT15E 抗体。

(A) 修飾抗体の調製

実施例 2 に記載の方法により AT15E 抗体を修飾した。¹⁴C-システインにより測定したところ、抗体 1 分子当たり 2.4 個のマレイミド基が導入されていた。

(B) 免疫毒素の調製

pH 7 の 12.5 mM リン酸緩衝液にリシン A 頭を溶かした溶液 8.3 mL (0.2 マイクロモル) を、上記で得られた活性型抗体の溶液 2.5 mL (0.65 マイクロモル) に加えた。続いて、その混合物を 30 ℃ にて 1 時間インキュベーションした。残ったマレイミド基を 9.25 マイクロモルのシステインで保護した。30 ℃ にて 1 時間インキュベーションし、この反応混合物を、実施例 1

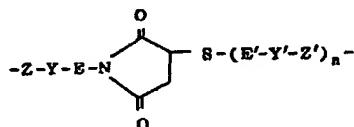
に記載した方法通りセファデックス G 100 を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度 1 mg/mL の溶液 9.0 mL (2.05 mg) を得た。この溶液は、1 mL 当り修飾された A 頭 (NEM) 0.27 mg を含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体 1 分子当たり A 頭 (NEM) 1.8 であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A' は、リシン A 頭のラジカル。

P' は、AT15E 抗体のラジカル。および、

W' は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z は -NH-
- ・ Y は -CO-
- ・ E は -(CH₂)₅-

・ n は せき

・ n は 1.8。

(C) 活性試験

テスト-2 (有細胞系)

このテストは、Thy 1.2 抗原を有するマウス T 細胞白血病の細胞を用いた以外は実施例 1 と同じ条件下で実施した。活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下での IC₅₀ は 10^{-9} モル/ℓ であった。この値は、A 頭のそれ (IC₅₀ は 5×10^{-7} モル/ℓ) より 500 倍高かった。

実施例 9

P₁ は、天然状態のリシン A 頭。

P₂ は、チロシンの水添基を介して導入された活性型ジスルフィド基を有する T101 抗体。

(A) カップリング試薬の調製

実施例 6 に同じ

(B) 修飾抗体の調製

2 倍希釈した前記 THF 溶液 3.4 mL (IgG 濃度は 200 ドラム/モル) を、T101 抗体 1.28 mg を 1.8 mL の pH 7 の 12.5 mM リン酸緩衝液に溶

かした溶液に滴下した。この反応溶液を室温にて15分間攪拌し、続いて透析により精製したところ、濃度4.5mg/mlの修飾抗体の溶液2.6mlを得た。2-メルカプトエタノールとの交換反応により放出されたピリジン2-チオを343nmで分光測定法により解析したところ、得られた抗体は1分子当たり2.2個の活性基を有していることが分った。

(C) 免疫毒素の調製

濃度4.5mg/mlの活性型抗体の溶液2.5ml(0.075マイクロモル)を、濃度7.1mg/mlのリシンA鎖の溶液750μl(0.177マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を25℃にて18時間インキュベーションした。この反応混合物を、実施例1に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度0.8mg/mlの溶液1.3ml(1.04mg)を得た。この溶液は、1ml当たりA鎖(NEM)0.2mgを含んでいた。従って、この調製物のカップリングの程度は、抗体

モル/8)より 1.5×10^5 倍高かった。

実施例1-0

P₁は、天然状態のリシンA鎖。

P₂は、チロシンの水酸基を介して導入されたマレイミド基を有するT101抗体。

(A) カップリング試薬の調製

実施例7と同じ。

(B) 修飾抗体の調製

2倍希釈した前記THF溶液344μl(IgG濃度は200当量/モル)を、T101抗体1.28mgを1.8mlのpH7の125mMリン酸緩衝液に溶かした溶液に滴下した。この反応溶液を室温にて15分間攪拌し、続いて透析により精製したところ、濃度4.5mg/mlの修飾抗体の溶液2.6mlを得た。¹⁴C-システインによるマレイミド基を測定したところ、得られた抗体は1分子当たり4個の活性基を有していることが分った。

(C) 免疫毒素の調製

濃度4.5mg/mlの活性型抗体の溶液2.5ml(0.075マイクロモル)を、濃度7.1mg/mlの

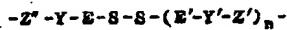
1分子当たりA鎖(NEM)1.5であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、リシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団。



上式中、

・ Z'は-O-

・ Yは-CO-

・ Eは-CH₂-CH₂-

・ Rは-CH₂-;

・ nは1.5。

(D) 活性試験

テスト-2(有細胞系)

実施例1と同じ条件下で試験を実施した。活性剤(50nMモネンジン)存在下でのIC₅₀は 3.5×10^{-13} モル/8であった。この値は、その細胞毒活性がA鎖のそれ(IC₅₀は 0.6×10^{-6}

モル/8)より 1.5×10^5 倍高かった。

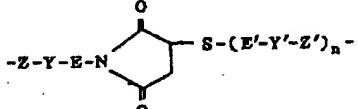
リシンA鎖の溶液850μl(0.20マイクロモル)に加えた。続いて、その混合物を25℃にて1時間インキュベーションした。残ったマレイミド基を6マイクロモルのシスティンで保護した。この反応混合物を、実施例1に記載した方法通りセファデックスG100を詰めたカラム上でゲル通過して精製した。この結果、濃度0.76mg/mlの免疫毒素溶液1.1ml(1.04mg)を得た。この溶液は、1ml当たりA鎖(NEM)0.29mgを含んでいた。従って、この調製物の平均のカップリングの程度は、抗体1分子当たりA鎖(NEM)3であった。

この結果、前記Ⅲ式の免疫毒素が得られた。この式中で、

A'は、リシンA鎖のラジカル。

P'は、T101抗体のラジカル。および、

W'は、次の式で示される原子団。



上式中、

- ・ Z は -O-
- ・ Y は -CO-
- ・ E は -(CH₂)₅-
- ・ n は 整数；
- ・ m は 3。

④ 活性試験

テスト - 2 (有細胞系)

このテストは、実施例 1 と同じ条件下で実施した。活性剤 (50 nM モネンジン) 存在下での IC₅₀ は 1.7×10^{-12} モル / L であった。この値は、同実験において A 側のそれより 3×10^5 倍高かった。

出願人代理人弁理士 鈴 江 武 義